

## 明細書

## 炭素化合物が封入された微小粒子の複合体

## 5 技術分野

本発明は、黒鉛やダイヤモンドを除く、炭素原子数30～2000からなる閉殻構造の炭素化合物がブロックコポリマーに由来する構造物（またはポリマーミセル）内に封入された微小粒子の複合体、該微小粒子にさらに金属の超微小粒子が内包されている微小粒子の複合体、並びにこれらの複合体の使用に関する。

## 10 背景技術

炭素原子のみからなる閉殻構造をとるフラーレンおよびカーボンナノチューブは、それらの新規な構造のため、多岐にわたる技術分野、例えば、医薬、体内診断、化粧品、等での使用が期待されている。

しかし、フラーレンは水に不溶性であることから、これらの技術分野でフラーレンを使用するには一定の制限があった。そのため、フラーレンを可溶化するためにフラーレンの炭素原子にヒドロキシル基を導入した各種フラロールが提供されている（例えば、特開平7-048302号公報参照。）。また、金属内包フラーレンにあっては、その表面をスルホン基、ケトン基、アミノ基およびアルキル基からなる群より選ばれる官能基を有する多糖類で被覆したものも提供されている（例えば、  
15 特開平7-048302号公報参照。）。  
20

さらに、フルオロアルキル鎖が末端に付加されたアクリロイルモルホリンオリゴマーまたはN,N-ジメチルアクリルアミドオリゴマー等の水溶液中にフラーレンを加えて十分に攪拌すると、可溶化されたフラーレンの量が約100 $\mu$ g/mlとなる自己組織化物（自己アセンブリー）が得られることが報告されている（J o u  
25 r n a l o f C o l l o i d a n d I n t e r f a c e S c i e n c e, 263, (2003), 1-3参照）。さらに、フラーレン（例えば、フラーレンC<sub>60</sub>）の電子受容性を利用した電荷移動錯体化、また、親水性ポリマー、例えば、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ〔（ジメチルアミノ）エチルメタクリレート〕等を用いるフラーレンのグラフト化によるC<sub>60</sub>含

有ポリマーとすることによりフラーレンが可溶性になることも知られているが、さらなる $C_{60}$ -*b*-ポリ [(ジメチルアミノ) エチルメタクリレート] の提供およびその物理学的性質について検討されている。(Dai et al., Langmuir 2004, PAGE EST: 6. 8 A-G)。ちなみに、このブロック

5 ポリマーは、水性溶媒中でフラーレンをコアとし、そしてポリマーをシェルとするミセルを形成して可溶化されることが示唆されている。

#### 発明の開示

上述したとおり従来技術では、フラーレンの可溶化に一定の成功が得られている。例えば、Journal of Colloid and Interface

10 Science, 263, (2003), 1-3によれば、フラーレンの水溶性は従来、 $21.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ であったものを、フラーレンと上記のオリゴマーを室温で約5日間攪拌することにより約 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ まで溶解性が向上した自己組織化物が取得できる旨報告されている。しかし、医薬、体内診断、化粧品等の技術分野で使用するには、このようなフラーレンの溶解度では必ずしも満足できるもので

15 ない。他方、 $C_{60}$ 含有ポリマーもフラーレンの水溶性を高めるが、それらの調製は必ずしも容易でない。したがって、本願発明の目的は、フラーレンを含んでなる安定な水溶液または分散液を提供できるとともに、水に対して、より高い溶解度を示すフラーレンが封入された微小粒子、並びにそれらの簡易な製造方法および用途を提供することにある。

20 本発明者らの一部と共通する著者による K. Kataoka et al., Macromolecules 1999, 32, 6892-6894は、DNA等の生体内標的への有力な送達手段として、DNAとポリエチレングリコール-*b*-*l*ock-ポリ (2-(N,N-ジメチルアミノ) エチルメタクリレート) のポリマーミセル複合体を提供した。他方、本発明者らは、アニオン荷電性を有するDNA等とは物性も構造も全く異なる

25  $C_{60}$ フラーレンが、ポリエチレングリコール-*b*-*l*ock-ポリ (2-(N,N-ジメチルアミノ) エチルメタクリレート) 等のブロックコポリマーと水溶液中で複合体を形成することにより、該フラーレンが効果的に可溶化できることを見出した。さらに、このような改良された可溶化方法により形成される複合体は、従来法により得られる複合体に比べより高い水溶性を示し、水溶液状態において高濃度で安定

に保持できることも確認された。

またさらに、このような改良された可溶化方法によれば、 $C_{60}$ フラーレンに限らず、広範な、炭素原子数30～2000、好ましくは60～120からなる閉殻構造の炭素化合物、さらには該炭素化合物が金属超微細粒子を内包する場合ですら、  
5 水に対する高い溶解度を示し、かつ、水性媒体中で安定に存在しうる微小粒子の複合体が提供され得ることも確認された。また、該炭素化合物のみが封入されたブロックコポリマーの構造物は、水性媒体中で活性酸素を強く消去する効果を有し、食品、医薬および化粧品の分野で、広汎かつ、都合よく使用できることも確認された。

したがって、本発明によれば、炭素原子数30～2000炭素原子から本質的  
10 になる閉殻構造の炭素化合物がポリマー鎖により被覆された微小粒子の複合体であって、該微小粒子が、第三級アミノ基および／または第二級アミノ基を側鎖に担持した反復単位を含有するポリマー鎖セグメントおよびポリ(エチレングリコール)鎖セグメントを含んでなるブロックコポリマーに由来し、かつ、前者のセグメントをコアとし、後者のセグメントをシェルとする構造物内に該炭素化合物が封入さ  
15 れていることを特徴とする微小粒子の複合体、が提供される。

また、別の態様の発明として、炭素原子数30～2000の炭素原子から本質的になる閉殻構造の炭素化合物および第三級アミノ基および／または第二級アミノ基を側鎖に担持した反復単位を含有するポリマー鎖セグメントおよびポリ(エチレングリコール)鎖セグメントを含んでなるブロックコポリマーを双極性非プロトン  
20 性溶媒に溶解し、混合し、次いで分画分子量が12000～14000である透析膜を介して水性溶媒に対して透析することにより、該炭素化合物がブロックコポリマー由来の構造物内に封入されている微小粒子の複合体を取得すること、を特徴とする上記微小粒子の複合体の製造方法も提供される。

さらなる別の態様の発明として、上記微小粒子の複合体を有効成分とする活性酸素消去剤、も提供される。  
25

さらなる別の態様の発明として、炭素原子数30～2000の炭素原子から本質的になる閉殻構造の炭素化合物がポリマー鎖により被覆された微小粒子の複合体であって、該微小粒子が、第三級アミノ基および／または第二級アミノ基を側鎖に担持した反復単位を含有するポリマー鎖セグメントおよびポリ(エチレングリコー

- ル)鎖セグメントを含んでなるブロックコポリマーに由来し、かつ、前者のセグメントをコアとし、後者のセグメントをシェルとする構造物内に該炭素化合物が封入されており、かつ該炭素化合物の閉殻構造内に金属元素もしくはそのイオン形態にある金属の超微小粒子が内包されていることを特徴とする微小粒子の複合体、も提供される。

本発明に従う微小粒子の複合体は、調製後に一度凍結乾燥して粉末状にした場合であっても、水中に極めて容易に高濃度で分散もしくは溶解し、透明もしくは均質で、かつ安定な溶液を形成しうる粉末状物を提供できる。

#### 図面の簡単な説明

- 図 1 は、P B S の ESR スペクトログラムである。
- 図 2 は、本発明のフラーレン複合体の水溶液の E S R スペクトログラムである。
- 図 3 は、本発明のフラーレン複合体の水溶液のフラーレン濃度に対する活性酸素補足能をプロットしたグラフである。
- 図 4 は、本発明の G d 内包フラーレン複合体の透過型電子顕微鏡 (T E M) 観察結果を表す図面に代わる写真である。

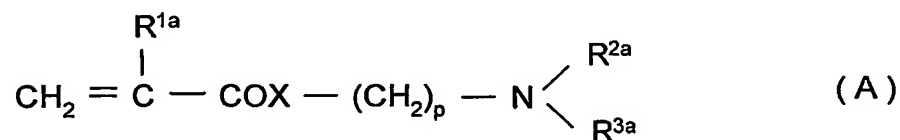
#### 発明を実施するための最良の形態

- 本発明にいう、「炭素原子から本質的になる」とは、本発明の目的に沿う限り、炭素原子以外に炭素原子数の 1 0 % 以下、好ましくは 5 % 以下、さらに好ましくは 1 % 以下のヒドロキシル基、オキシ基、等を含んでいてもよいことを意味する。しかし、本発明にいう炭素化合物で特に好ましいのは、炭素原子のみからなる炭素化合物である。また、閉殻構造とは、限定されるものでないが、フラーレンまたはカーボンナノチューブ等がとり得る既知の構造のほか炭素原子が密に詰まった網目構造や、一方向または二方向に湾曲していてもよい網目構造を意味し、例えば、国際公開 (WO) 第 9 3 / 1 5 7 6 8 号パンフレットに記載されたものであることができる。しかし、本発明の用途を考慮すると、本発明にいう炭素化合物は、所謂、サッカーボール状構造体であることが好ましく、特に、それら自体公知の  $C_{60}$ 、 $C_{84}$ 、 $C_{32}$ 、 $C_{50}$ 、 $C_{66}$ 、 $C_{70}$ 、 $C_{76}$ 、 $C_{78}$ 、 $C_{90}$ 、 $C_{96}$  および  $C_{120}$  フラーレンをより好ましいものとして挙げるができる。

他方、かような炭素化合物を封入した構造物 (またはポリマーミセル) を形成し

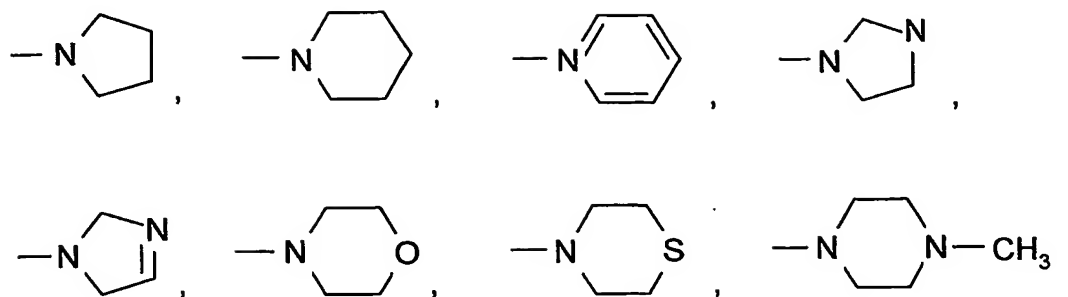
- うるブロックコポリマーは、親水性ポリマー鎖セグメントとして、ポリ（エチレングリコール）に由来するセグメントを含み、そして第三級アミノ基および／または第二級アミノ基を側鎖に担持した反復単位を含有するポリマー鎖セグメントとを含み、本発明の目的、例えば、 $C_{30} \sim C_{120}$  フラーレンまたは  $C_{2000}$  までのカーボンナノチューブを効率よく水に対して可溶化しうるものであれば如何なる分子種であつてもよい。

しかし、好ましくは、一般式（A）：



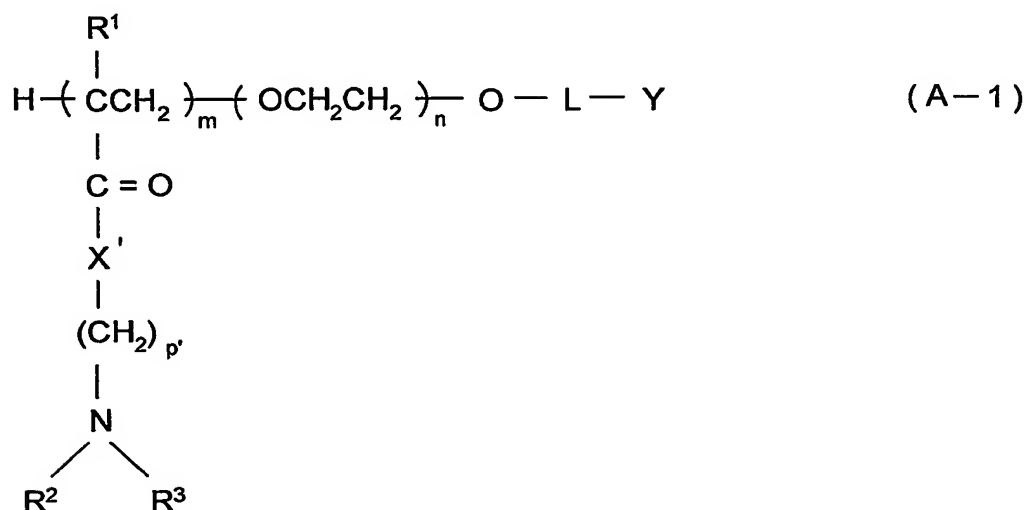
- 10 [式中、 $\text{R}^{1a}$ は水素原子または $\text{C}_{1-6}$ アルキル基を表し、 $\text{R}^{2a}$ および $\text{R}^{3a}$ は独立して $\text{C}_{1-6}$ アルキル基を表すか、または $\text{R}^{2a}$ および $\text{R}^{3a}$ は、それらが結合する窒素原子と一緒に、さらなる窒素原子1もしくは2個、酸素または硫黄原子1個を含んでいてもよい5もしくは6員の複素環を形成してもよく、  
Xは $-\text{O}-$ または $-\text{NH}-$ を表し、そして  
15 pは2～6の整数である。] で表されるモノマーに由来するセグメントを含むことができる。

- 上記の定義において使用されるアルキル基等について、 $\text{C}_{1-6}$ アルキル基は、炭素原子を1～6個有する直鎖もしくは分岐アルキルであり、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、*i*s*o*-プロピル、*n*-ブチル、*sec.*-ブチル、*tert.*-ブチル、*n*-ペンチル、*n*-ヘキシル等を包含する。また、 $\text{R}^{2a}$ と $\text{R}^{3a}$ が、それらが結合する窒素原子と一緒に、5もしくは6員の複素環を形成する場合としては、



を挙げることができる。

- 上記の親水性ポリマー鎖セグメントと第三級アミノ基および／または第二級アミノ基を側鎖に担持した反復単位を含有するポリマー鎖セグメントは、それぞれの
- 5 ポリマーを予め用意しておき、それらを当該技術分野で周知の連結手段により連結することにより、本発明で使用するブロックコポリマー内のセグメントとして組み込むことができる。また、本発明で使用するブロックコポリマーを提供しうる別法としては、いずれか一方のセグメントに相当するポリマーを用意しておき、そのポリマーの片末端にもう一方のセグメントを対応するモノマーから重合成長させる
- 10 ことにより形成してもよい。限定されるものでないが、このような方法の代表的なものとしては、前記の Kataoka et al., に記載の方法が挙げられ、また、かような方法に従って得られる、下記一般式 (A-1) :



- [式中、 $R^1$ は水素原子または $C_{1-6}$ アルキル基を表し、 $R^2$ および $R^3$ は独立して
- 15  $C_{1-6}$ アルキル基を表すか、または $R^2$ および $R^3$ は、それらが結合する窒素原子と

一緒になって、さらなる窒素原子 1 もしくは 2 個、酸素または硫黄原子 1 個を含んでいてもよい 5 もしくは 6 員の複素環を形成してもよく、

$X'$  は  $-O-$  または  $-NH-$  を表し、そして

$p'$  は 2 ～ 6 の整数であり；

5  $L$  は  $C_{1-6}$  アルキレンまたは原子価結合を表し、

$Y$  は水素原子、ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、アセタール化ホルミル基またはホルミル（もしくはアルデヒド）基を表し、

$m$  は 1 ～ 10,000 の整数であり、

$n$  は 10 ～ 20,000 の整数であり、そして

10  $p'$  は 2 ～ 6 の整数である]

で表されるブロックコポリマーを、本発明で都合よく使用できる。

炭素化合物を封入した構造物（またはポリマーミセル）は、上記のようなブロックコポリマーにより該炭素化合物の表面が十分に被覆され、そして該炭素化合物を水に対して可溶化するように構成されている物体を意味する。限定されるものではないが、このような構造物は、炭素化合物をコアとして封入しうるようにブロックコポリマーの第三級アミノ基および／または第二級アミノ基を側鎖に担持した反復単位を含有するポリマー鎖セグメントで内部コアもしくは中心部を構成し、そしてポリ（エチレングリコール）鎖セグメントが外部を覆うように、水性媒体中でブロックコポリマー分子が会合した分子集合体であることが好ましい（なお、このような分子集合体を、本明細書では、ポリマーミセルとも称することもある。）。上記および本明細書において使用する場合、水性媒体は、水、水と混和しうる有機溶媒（例えば、エタノール、アセトン、 $N, N$ -ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、アセトニトリル、等）と水の混合溶液、水または該混合溶液に、さらに、緩衝剤および／または浸透圧調整剤を含んでいてもよい、溶液を意味することができる。

理論により拘束されるものでないが、上記の構造物における水溶性の高いポリ（エチレングリコール）鎖セグメントは水性媒体中で可動性が極めて高く、ブラシ状に構造物表面を覆うことができるので、仮に、非水溶性の炭素化合物を内部に封入した場合でも、構造物全体を水に対して高度に可溶化できるものと理解される。

このような構造物からなる微小粒子の複合体は、例えば、ブロックコポリマーを溶解した水溶液にフラーレンを加えて、長時間に渡り攪拌することによるか、その他、炭素化合物とブロックコポリマーを、それらの両者を溶解しうる溶媒、例えば、塩化メチレン等に溶解した後、溶媒を留去し、次いで残留物を水に徐々に溶解して

5    いくような、一般的なポリマーミセルの調製に用いられている方法によっても得ることができる。しかし、これらの方法で得られるフラーレン等の炭素化合物を封入した微小粒子の複合体は、多くの場合、水に対する溶解度が限定されたもの（例えば、約  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  以下）しか得られなかった。

本発明者らは、さらにかような調製方法について検討したところ、一般的にはポリマーミセルの形成効率に劣るとされている方法の範疇に入る、双極性非プロトン性溶媒にフラーレンを初めとする炭素化合物とブロックコポリマーを溶解させ、次いで、透析処理することにより取得できる微小粒子の複合体は、上記の方法により取得できる複合体に比べ、水に対して有意に高い溶解度（例えば、約  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上、例えば、約  $1 \text{mg}/\text{ml}$  ～約  $4 \text{mg}/\text{ml}$ ）を示すことが確認できた。

10    したがって、上述した、微小粒子の複合体の製造方法も本発明の一態様として提供される。

かかる製造方法において使用できる、双極性非プロトン性溶媒としては、上記のように高い溶解度を提供できるものであれば、種類を問うことなく使用できるが、好ましくは、DMFおよびDMSOを挙げることができる。まず、このような溶媒中にフラーレンを初めとする炭素化合物とブロックコポリマーと溶解させる。溶解させる順序は、炭素化合物、次いでブロックコポリマーを、その逆に、ブロックコポリマー、次いで炭素化合物を、それぞれ順に溶解させるか、あるいは両者を同時に溶解させてもよい。溶解に際し、必要に応じて溶媒の沸点まで加温してもよいが、室温で処理してもよい。また、溶解および混合する際に、溶液を超音波処理してもよい。

20    25    こうして得られる溶液は必要に応じて、不溶物を濾過により除去した後、室温で一定時間（数時間ないし一晚）静置する。その後、所望の分画分子量の透析膜を介して、水、好ましくは蒸留水に対して透析する。透析は、通常、非処理溶液に対して約10倍以上の水に対して2時間、3回以上行い、最後は終夜で透析する。また、分画分子量12000～14000の透析膜を使用するのが好ましく、さらに、



透析膜は、使用前に蒸留水を用いて十分に膨潤させておくのがよい。上記の操作は、いずれも室温で実施できるが、必要により、冷却下（例えば、 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ ）、または加温下（ $40\sim 80^{\circ}\text{C}$ ）で行うこともできる。こうして、炭素化合物がポリマーミセル内に封入された微小粒子の複合体であって、室温、例えば $25^{\circ}\text{C}$ の蒸留水に対する溶解度が、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の複合体が、効率よく得られる。炭素化合物およびブロックコポリマーの混合液中での濃度は、使用溶媒に溶解できる限り、限定されないが、通常、溶液の体積当り、炭素化合物は、 $0.001\text{wt}\%\sim 10\text{wt}\%$ の範囲ないで、ブロックコポリマーは、 $0.001\text{wt}\%\sim 2\text{wt}\%$ の範囲内で使用するのが好都合である。

10      このような炭素化合物のみが封入された微小粒子の複合体は、ブロックコポリマーの構造物内に封入されており、炭素化合物のみが封入されているに過ぎないが、水性媒体中で強い活性酸素の消去作用を示す。したがって、活性酸素が悪影響を及ぼす環境、特に、生体内外において、活性酸素消去剤として使用できる。具体的な使用対象としては、有機もしくは無機の抗酸化剤またはスーパーオキシドダーゼジ  
15      スムターゼ（SOD）等が有利に使用できる分野、食品の例えば、脂質の酸化劣化の防止、化粧品の例えば、老化防止用スキンケア、または医薬における、例えば、制ガン剤等として使用できる。

上記の本発明の一態様として提供される微小粒子の複合体の製造方法によれば、上記の炭素化合物に替えて、金属の超微細粒子を内包した複合体を使用する場合であ  
20      っても、水に対する高い溶解度または水性媒体中に安定に保持できる均質分散液を提供できる。

したがって、上述した、該炭素化合物の閉殻構造内に金属元素もしくはそのイオン形態にある金属の超微小粒子が内包されていることも特徴とする微小粒子の複合体も別の態様の本発明として提供される。かような金属は、水性媒体に対して可  
25      溶化することにより有用性が高まる技術分野、例えば、医療、診断、食品、の技術分野で使用されているものであれば、如何なるものであってもよい。したがって、疾病もしくは生体の何らかの器官の傷害の検診または診断において使用する造影剤として使用されている金属、例えば、ガドリニウム（Gd）、ユウロピウム（Eu）、テルビウム（Tb）およびエルビウム（Er）からなる群より選ばれる元素

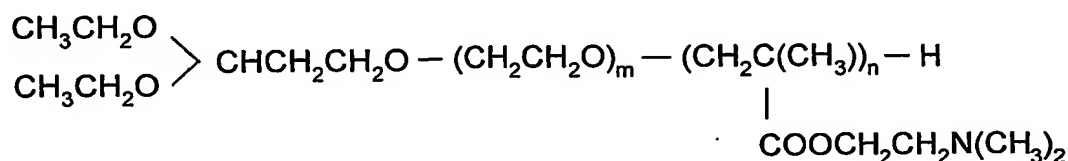
に由来する常磁性金属、その他、亜鉛、銅、マグネシウム、鉄、白金、等の酸化物を提供しうる元素に由来する金属、等が本発明にいう金属として使用される。これらの金属は、イオンの形態であることもできる。また、これらの金属は超微小粒子状態で炭素化合物に内包され得るが、超微小粒子とは、典型的には、上記のフラーレンまたはカーボンナノチューブに内包されうるサイズのものをいう。このような、金属が内包されたフラーレンは、一部は市販されており、それらをそのまま使用できるが、それ自体公知の方法、例えば、上記の特開平 8-143478 号公報に記載されているように、例えば、目的とする金属の酸化物を、グラファイトとともに、高温高圧下でレーザー蒸発させること等により得ることができる。

- 5  
10    なお、該炭素化合物の閉殻構造内に金属元素もしくはそのイオン形態にある金属の超微小粒子が内包されていることも特徴とする微小粒子の複合体に関するブロックコポリマー等についての好ましい態様は、上述した、炭素化合物のみが封入された複合体に対するものと共通する。

- 15    こうして、例えば、常磁性金属元素を内包した炭素化合物をブロックコポリマーで形成される構造物（またはポリマーミセル）内に封入した微小粒子の複合体は、水性媒体中に高濃度で安定に保持できるので、血管内に投与して使用する造影剤として有用である。

以下、具体例を参照しながら本発明をさらに詳細に説明するが、本発明をこれらに限定することを意図するものでない。

## 20    ブロックコポリマーの製造例



アセタールーPEG/PAMAの構造式

- アルゴン下 200 ml ナスフラスコに溶媒として蒸留テトラヒドロフラン (THF) 50 ml を入れ、開始剤として 3,3'-ジエトキシー-1-プロパノール (Mw=148、d=0.941) を 157 μl 入れた。その後、カリウムナフタレン (K-Naph (c=0.3656 mol/l)) を 2.73 ml 入れメタル化した。
- 25

- 次にエチレンオキシド (EO ( $M_w=44$ ,  $d=0.88$ )) 5.68 ml を入れた後水冷下で2日間攪拌した。2日後、少量をサンプリングし、GPCで解析を行った後、2-(N,N-ジメチルアミノ)エチルメタクリレート (PAMA;  $MW=157.21$ ) を4.29 ml 入れ、氷冷下で30分攪拌し、GPCでサンプリングを行った。最後にメタノールで反応を停止させた。

反応停止後、イソプロピルアルコール再沈、遠心分離を行い、ベンゼン凍結乾燥をし、回収した。

精製したポリマーの分子量はPEG/PMAMA=4,500/5,500であった。

#### 10 複合体の製造例1： 透析法による水中でのフラーレンの分散安定化

- C<sub>60</sub>フラーレン：アセタール-PEG-PMAMAブロックコポリマー (PEG/PAMA=4,500/5,500) の混合比 (F:P) が、1:0、1:0.5、1:1となるように溶媒ジメチルホルムアミド (DMF) 25 ml 中にフラーレン1 mg、ブロックコポリマー13.8 mgを加え (F:P=1:1の場合)、6時間超音波処理を行った後、一晩静置した。その後、蒸留水で一晩膨潤させた分画分子量12000-14000の透析膜中に溶液を入れ、透析を行った (水交換3回)。こうして得られた30 ml のフラーレン内包微小粒子の溶液の溶媒を凍結乾燥により除去し、その後蒸留水5 mL加え、再分散させた。その後、再度DLS測定を行った。

- 20 こうして得られる濃縮溶液はフラーレン特有の黒褐色を呈した。ブロックコポリマー非存在下では濃縮によって濁度を生ずるものの、本発明に従う複合体では凍結乾燥後にも極めて容易に水中に分散溶解した。混合比がF:P=1:1、1:0.5のものについて再度DLS測定を行ってみたところ、濃縮再分散を行う前よりはフォトンカウントが増加したが、以前測定した値に比べて十分なフォトンカウントを得ることができなかった。このように以上の条件で調製したフラーレン粒子は光散乱で検出できる粒径 (およそ3 nm) 以下のほぼ分子状分散に近い形で分散しているものと推測される。

複合体の製造例2：バブリング蒸発法による水中でのC<sub>60</sub>フラーレンの分散安定化

フラーレン1mgを塩化メチレン溶媒25mlに混ぜ、超音波をかけることで塩化メチレン中に溶解させた。その後、アセタールーPEG-PMAMAブロックコポリマー(PEG/PMAMA=4,500/5,500)139mgを溶媒に入れ、超音波を2時間かけた後、一晩静置した。

- 5      このようにして調製した塩化メチレン溶液を、アルゴンバブリングをしている蒸留水40mlに滴下していった。こうして調製した溶液は、上記の製造例1に記載のものと同様に、淡黄色の透明溶液を与える微小粒子の複合体を提供した。得られた水中分散安定化フラーレン複合体の溶液のDLS測定を行った結果、粒径170nm程度のナノ粒子が形成されていることが確認できた。

10    複合体の製造例3： 高濃度フラーレン水溶液の製造例

- C<sub>60</sub>フラーレン100mgを150mlのDMF溶液に室温下で混合し、超音波処理を3時間施した。その後、溶液を0.45μm(ミリポア社製)の疎水性フィルターで溶媒に不溶な物質を除去し、次いで溶媒に対してポリマー濃度が5mg/mlになるようにアセタールーPEG-PMAMAブロックコポリマー(PEG/PMAMA=5,000/5,900)を加えて一晩静置した。その後、蒸留水に一晩膨潤させた分画分子量12000-14000の透析膜製のバッグに溶液を入れ、DMF：蒸留水(150：2000)2リットルに対して透析を行った(水交換：5回、2、4、6、8、10時間目に交換、24時間後に回収)。

- その後、透析処理済の溶液を凍結乾燥し、粉末にした後、そのサンプルを400μlの蒸留水を用いて再溶解させ、UV-Visスペクトル測定を行い、フラーレンの吸光度から溶解度を算出したところ、2.9mg/mlという高濃度でフラーレンを水中に可溶化することができた。

フラーレン封入微小粒子の複合体の活性酸素の消去作用の確認

- スピントラップ剤である5,5-ジメチルー1-ピロリン N-オキシド(DMPO)をMilliQで2倍希釈したものを30μl、MilliQで調製した100mMリン酸緩衝化溶液(PBS)で調製した5mMヒポキサンチン(HPX)を50μl、9.625mMジエチレントリアミン-N,N,N',N'',N''-五酢酸(DTPA)を20μlサンプル(1. PBS, 2. フラーレン溶液)各50μl、0.4U/mlキサンチンオキシダーゼ(XOD)の50mlを

順に容器に入れ、XOD添加90秒後にESRを用いてスペクトル測定を行った。

ESRスペクトル法の測定条件は、出力：9mW、中心磁場：339.9mT、掃引幅：±5mT、変調幅：79μT、掃引時間：1分、増幅：630、応答時間（Time constant：0.1秒であった。

- 5 サンプルとしてPBS、およびアセタールーPEG-PMAMAブロックコポリマー（PEG/PMAMA=5,000/5,900）のポリマーミセル封入フラーレン微小粒子溶液のESRスペクトログラムをそれぞれ、図1および図2に示す。これらのスペクトルを積分し、面積を比較することにより活性酸素抑制効果を比較した。活性酸素抑制作用のないPBSを用いたものを100%としたとき、微小粒子
- 10 溶液の面積は約30%であった。

図3には、フラーレン濃度に対する活性酸素補足能をプロットした結果を示す。この結果から、 $IC_{50\text{fullerene}} = 361.76 \mu\text{g/ml}$ であった。

#### ガドリニウム内包フラーレンとアセタールーPEG-PMAMAブロックコポリマーの複合体の製造、および水緩和時間の測定

- 15 Gd内包 $C_{82}$ フラーレン（Gd@ $C_{82}$ ）1mgをDMF10mgと混合し、3時間超音波処理を施した。その後、DMFに対して濃度が5mg/mlになるようにアセタールーPEG-PMAMAブロックコポリマー（PEG/PMAMA=5,000/5,900）を入れ、1時間超音波処理を施した。次いで、一晚蒸留水中で膨順させた分画分子量12000-14000の透析膜製のバッグに上記処理液
- 20 を入れ、蒸留水2リトルに対して透析を行った（水交換3回、2、5、10時間目、そして24時間後に回収した）。調製したサンプルの透過型電子顕微鏡（TEM）観察結果を表す図面に代わる写真を図4に示す。

- 調製したa) Gd@ $C_{82}$ /ブロックコポリマーの複合体およびb)  $C_{60}$ /ブロックコポリマーの複合体をそれぞれ $H_2O : D_2O = 50 : 50$ の混合溶媒中に溶かし、サンプルを調製した。フラーレン濃度はUV-Visスペクトルの吸光度より
- 25 算出し、それぞれ（a） $23.36 \times 10^{-3} \text{mM}$  および（b） $31.93 \times 10^{-3} \text{mM}$ であった。

緩和時間測定（ $T_1$ 測定）は、まず、Null法を用いて $T_{1\text{ null}}$ ポイントを求め、その値によって $T_1$ を推測し、測定条件をそれぞれ設定して測定した。

緩和時間短縮効果を表す指標が緩和度（または緩和能、relaxivity (R)) であり、造影剤濃度をC (mol/l)、造影前の縦緩和時間（つまり、溶媒の縦緩和時間）を $T_{10}$ 、造影剤投与後の緩和時間（サンプル存在下での緩和時間）を $T_{1p}$ とすると、Rは次式で定義される。

$$R_1 = \frac{\frac{1}{T_{1p}} - \frac{1}{T_{10}}}{C}$$

5

ここで、緩和時間の逆数である $1/T_1$ は緩和速度 (relaxation rate) と呼ばれ、その名のとおり緩和の速さを示す指標である。また、緩和度(R) は造影剤が組織に分布して単位濃度になった場合にどれだけ緩和速度が速くなるかを示している。すなわち、Rが大きければ大きいほど造影剤の緩和速度促進効果 (緩和時間短縮効果) が大きいことを意味する。

10

それぞれのサンプルの濃度および $T_1$ 、使用溶媒の緩和時間を基に緩和度Rを算出し、比較検討を行った。結果を表1に示す。表1からGd@C<sub>82</sub>/ポリマーの複合体は有意にR値が高く、MRI用造影剤として有望である。

15

表1

| サンプル                              | $T_1$ (秒)  | $R_1$    |
|-----------------------------------|------------|----------|
| Gd@C <sub>82</sub> /ポリマー          | 2. 7 2 6   | 1 3. 3 6 |
| C <sub>60</sub> /ポリマー             | 4. 4 0 2   | 5. 4     |
| D <sub>2</sub> O+H <sub>2</sub> O | 1 8. 2 7 1 | 0        |

### 産業上の利用可能性

20

本発明に従う、フラーレンもしくはカーボンナノチューブまたは金属内包フラーレンとブロックコポリマーとの微小粒子の複合体は、フラーレンを水可溶化しうるので、医薬、診断薬等の分野でのフラーレンの使用範囲を拡大できる。したがって、本発明は医薬製造業等で利用できる。

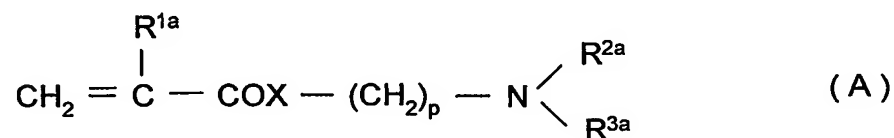
## 請求の範囲

1. 炭素原子数30～2000の炭素原子から本質的になる閉殻構造の炭素化合物がポリマー鎖により被覆された微小粒子の複合体であって、

- 5 該微小粒子が、第三級アミノ基および／または第二級アミノ基を側鎖に担持した反復単位を含有するポリマー鎖セグメントおよびポリ(エチレングリコール)鎖セグメントを含んでなるブロックコポリマーに由来し、かつ、前者のセグメントをコアとし、後者のセグメントをシェルとする構造物内に該炭素化合物が封入されていることを特徴とする微小粒子の複合体。

- 10 2. 25℃の蒸留水における溶解度が、0.5mg/ml以上である請求項1記載の微小粒子の複合体。

3. 第三級アミノ基および／または第二級アミノ基を側鎖に担持した反復単位を含有するポリマー鎖セグメントが、一般式(A)：

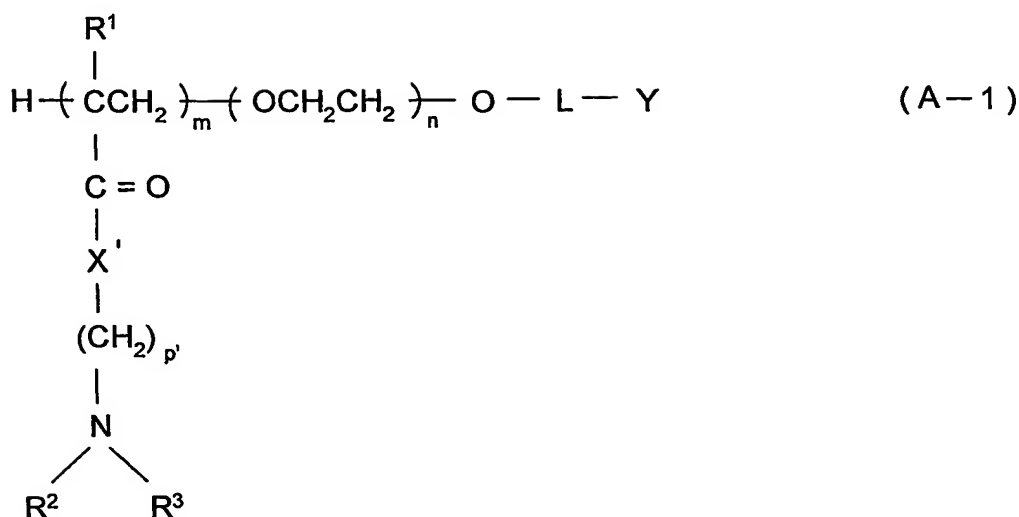


- 15 [式中、R<sup>1a</sup>は水素原子またはC<sub>1-6</sub>アルキル基を表し、R<sup>2a</sup>およびR<sup>3a</sup>は独立してC<sub>1-6</sub>アルキル基を表すか、またはR<sup>2a</sup>およびR<sup>3a</sup>は、それらが結合する窒素原子と一緒に、さらなる窒素原子1もしくは2個、酸素または硫黄原子1個を含んでいてもよい5もしくは6員の複素環を形成してもよく、

Xは—O—または—NH—を表し、そして

- 20 pは2～6の整数である。] で表されるモノマーに由来し、そして25℃の蒸留水における溶解度が、0.5mg/ml以上である請求項1に記載の微小粒子の複合体。

4. ブロックコポリマーが、一般式(A-1)：



- [式中、 $\text{R}^1$ は水素原子または $\text{C}_{1-6}$ アルキル基を表し、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ は独立して $\text{C}_{1-6}$ アルキル基を表すか、または $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ は、それらが結合する窒素原子と一緒に、さらなる窒素原子1もしくは2個、酸素または硫黄原子1個を含んでいてもよい5もしくは6員の複素環を形成してもよく、  
 $\text{X}'$  は $-\text{O}-$ または $-\text{NH}-$ を表し、そして  
 $p'$  は2～6の整数であり；  
 $\text{L}$ は $\text{C}_{1-6}$ アルキレンまたは原子価結合を表し、  
 $\text{Y}$ は水素原子、ヒドロキシ基、カルボキシ基、アミノ基、アセタール化ホルミル基またはホルミル（もしくはアルデヒド）基を表し、  
 $m$ は1～10,000の整数であり、  
 $n$ は10～20,000の整数であり、そして  
 $p'$  は2～6の整数である]で表される請求項1～4のいずれか1項に記載の微小粒子の複合体。
5. 炭素化合物が炭素原子のみからなる $\text{C}_{30-120}$ フラーレンである請求項1～4のいずれか1項に記載の微小粒子の複合体。
6. 炭素原子数30～2000の炭素原子から本質的になる閉殻構造の炭素化合物および第三級アミノ基および／または第二級アミノ基を側鎖に担持した反復単位を含有するポリマー鎖セグメントおよびポリ(エチレングリコール)鎖セグメントを含んでなるブロックコポリマーを双極性非プロトン性溶媒に溶解、混合し、次



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

いで分画分子量が12000～14000である透析膜を介して水性溶媒に対して透析することにより、形成された該炭素化合物がブロックコポリマー由来の構造物内に封入された微小粒子を取得すること、を特徴とする請求項1に記載の微小粒子の複合体の製造方法。

- 5 7. 請求項1～5のいずれかの1項に記載の微小粒子の複合体を有効成分とする活性酸素消去剤。

8. 食品、医療または皮膚科学的もしくは化粧品分野で使用するものである請求項7記載の活性酸素消去剤。

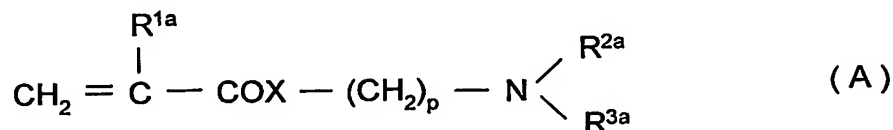
9. 炭素原子数30～2000の炭素原子から本質的になる閉殻構造の炭素化合物がポリマー鎖により被覆された微小粒子の複合体であって、

- 10 該微小粒子が、第三級アミノ基および／または第二級アミノ基を側鎖に担持した反復単位を含有するポリマー鎖セグメントおよびポリ(エチレングリコール)鎖セグメントを含んでなるブロックコポリマーに由来し、かつ、前者のセグメントをコアとし、後者のセグメントをシェルとする構造物内に該炭素化合物が封入されており、かつ該炭素化合物の閉殻構造内に金属元素もしくはそのイオン形態にある金属の超微小粒子が内包されていることを特徴とする微小粒子の複合体。

10. 金属元素もしくはそのイオン形態にある金属が常磁性金属である請求項9に記載の微小粒子の複合体。

11. 常磁性金属が、ガドリニウム、ユウロピウム、テルビウムおよびエルビウムからなる群より選ばれる元素に由来するものである請求項10に記載の微小粒子の複合体。

12. 第三級アミノ基および／または第二級アミノ基を側鎖に担持した反復単位を含有するポリマー鎖セグメントが、一般式(A)：



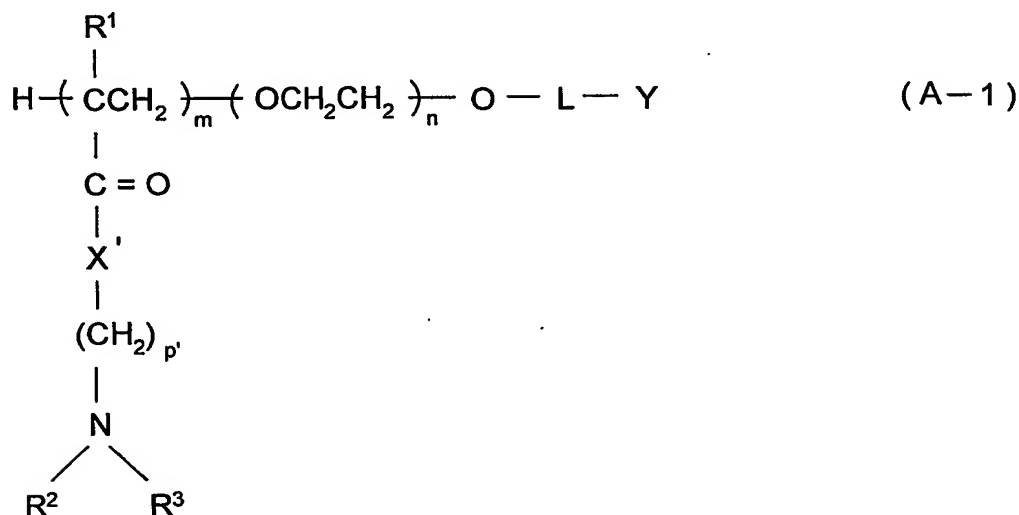
- 25 [式中、R<sup>1a</sup>は水素原子またはC<sub>1-6</sub>アルキル基を表し、R<sup>2a</sup>およびR<sup>3a</sup>は独立してC<sub>1-6</sub>アルキル基を表すか、またはR<sup>2a</sup>およびR<sup>3a</sup>は、それらが結合する窒素原子と一緒にあって、さらなる窒素原子1もしくは2個、酸素または硫黄原子1個

を含んでいてもよい5もしくは6員の複素環を形成してもよく、

Xは—O—または—NH—を表し、そして

pは2～6の整数である。] で表されるモノマーに由来する請求項9～11のいずれかの1項に記載の微小粒子の複合体。

- 5 13. ブロックコポリマーが、一般式 (A-1) :



- [式中、R<sup>1</sup>は水素原子またはC<sub>1-6</sub>アルキル基を表し、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は独立してC<sub>1-6</sub>アルキル基を表すか、またはR<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は、それらが結合する窒素原子と一緒に、さらなる窒素原子1もしくは2個、酸素または硫黄原子1個を含んでいてもよい5もしくは6員の複素環を形成してもよく、
- 10 X' は—O—または—NH—を表し、そして
- p' は2～6の整数であり；
- LはC<sub>1-6</sub>アルキレンまたは原子価結合を表し、
- Yは水素原子、ヒドロキシ基、カルボキシ基、アミノ基、アセタール化ホルミル基またはホルミル（もしくはアルデヒド）基を表し、
- 15 mは1～10,000の整数であり、
- nは10～20,000の整数であり、そして
- p' は2～6の整数である] で表される請求項12に記載の微小粒子の複合体。

14. 請求項11または12に記載の微小粒子の複合体を有効成分として含んで
- 20 なる造影剤。

Fig. 1

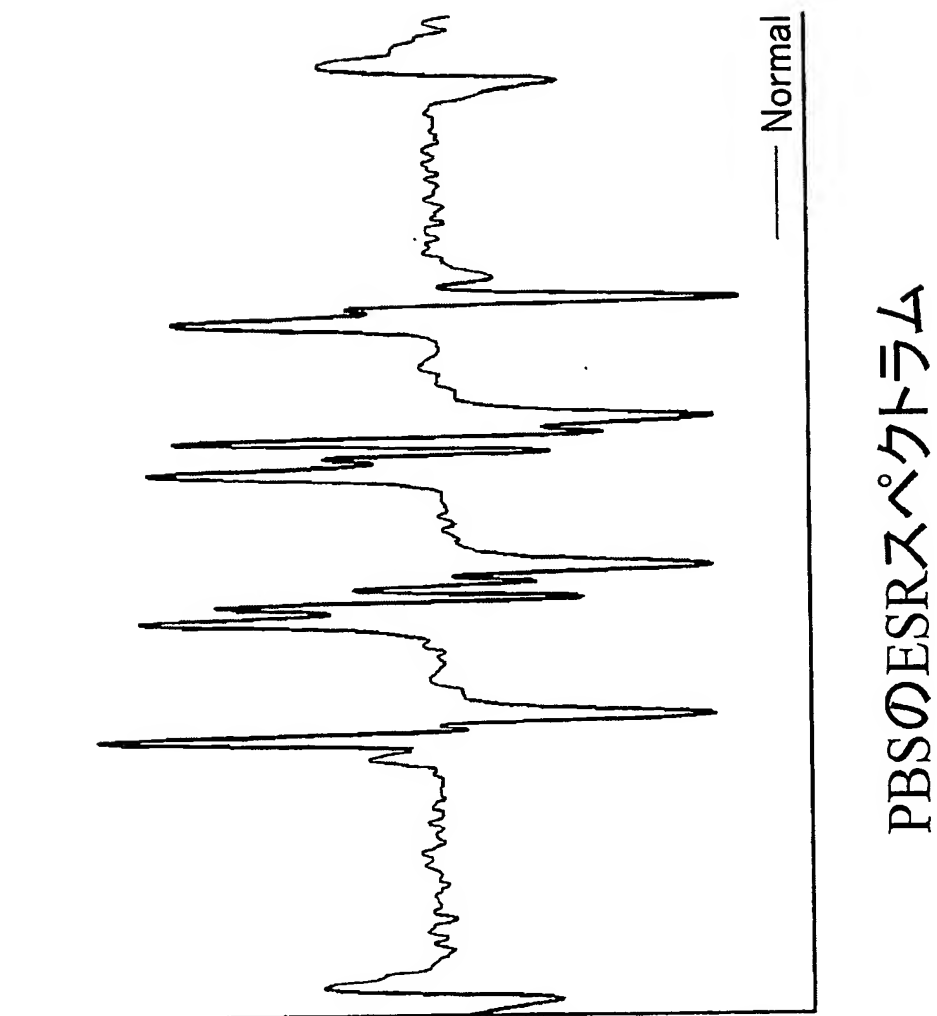
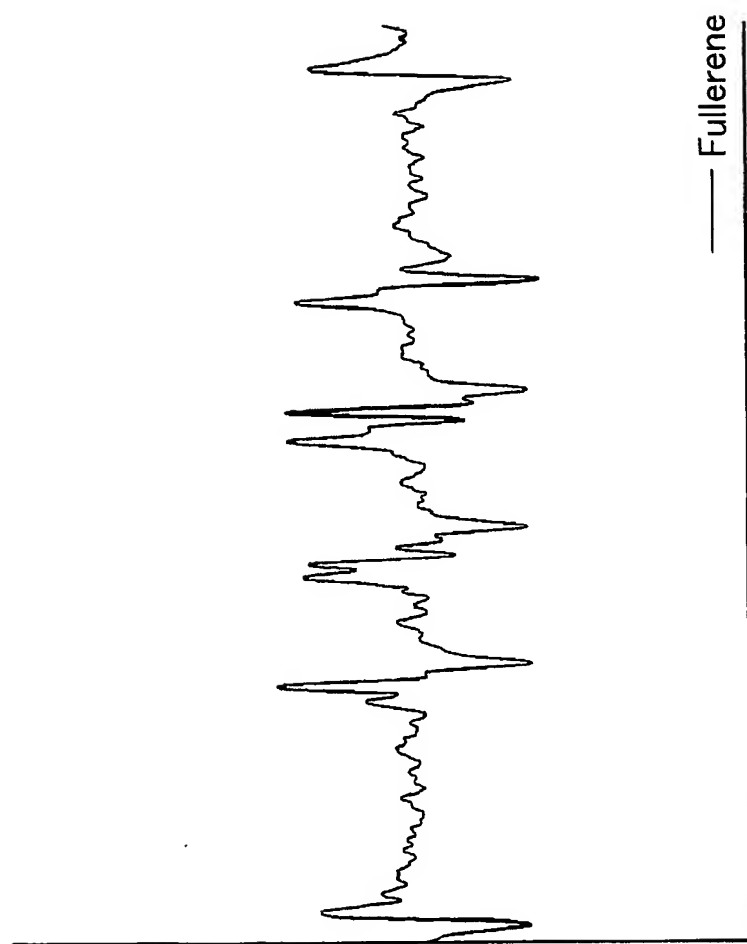


Fig. 2



フラーレン複合体溶液のESRスペクトラム

Fig. 3

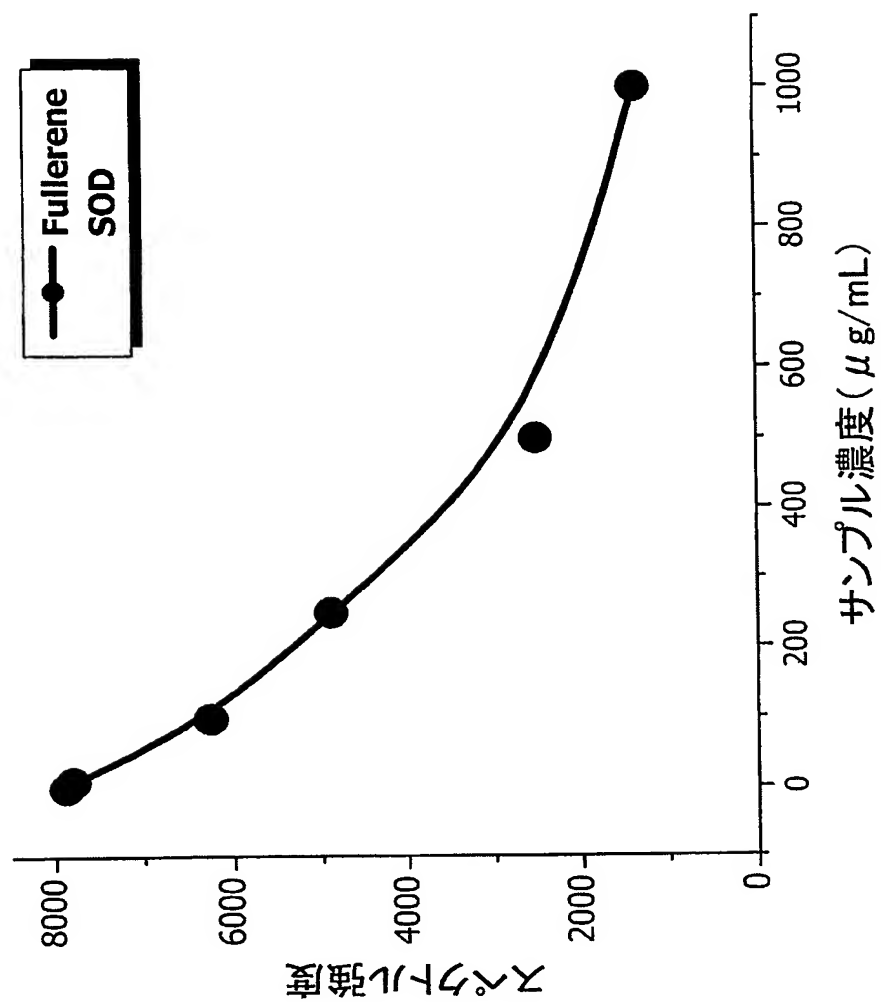
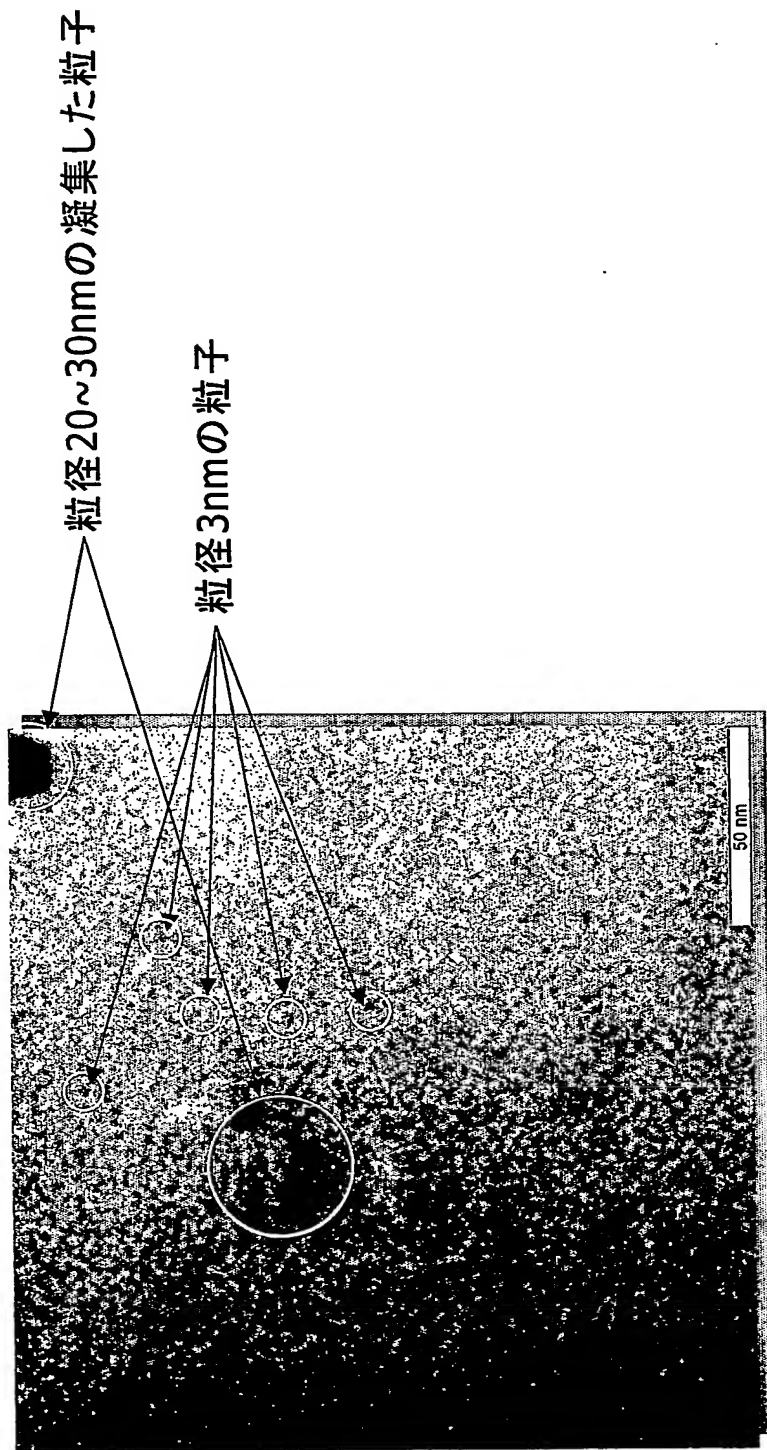


Fig. 4

Gd@C<sub>82</sub>/PEG-PMAMA の TEM 画像

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013255

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C08L53/00, C08F293/00, C08G81/02, A61K31/131, 9/14, 47/34, 51/04, 7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C08L53/00, C08F293/00, C08G81/02, A61K31/131, 9/14, 47/34, 51/04, 7/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A         | JP 2002-241307 A (Yasuhiko TAHATA),<br>28 August, 2002 (28.08.02),<br>All references<br>& WO 2066061 A1 & EP 1362598 A1<br>& US 2004-0068207 A | 1-13                  |
| A         | JP 9-235235 A (Research Institute For<br>Production Developmen),<br>09 September, 1997 (09.09.97),<br>All references<br>(Family: none)         | 1-13                  |
| A         | JP 2003-147418 A (Japan Science and<br>Technology Corp.),<br>21 May, 2003 (21.05.03),<br>All references<br>& WO 03/39793 A1                    | 1-13                  |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 October, 2004 (18.10.04)Date of mailing of the international search report  
02 November, 2004 (02.11.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



|  |   |                  |
|--|---|------------------|
| <b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b><br>Int. Cl <sup>7</sup> C08L53/00, C08F293/00, C08G81/02,<br>A61K31/131, 9/14, 47/34, 51/04, 7/00   |   |                  |
| <b>B. 調査を行った分野</b><br>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))<br>Int. Cl <sup>7</sup> C08L53/00, C08F293/00, C08G81/02,<br>A61K31/131, 9/14, 47/34, 51/04, 7/00   |   |                  |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの   |   |                  |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  |   |                  |
| <b>C. 関連すると認められる文献</b>   |   |                  |
| 引用文献の<br>カテゴリー*  | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A  | JP 2002-241307 A (田畑泰彦) 2002.08.28, 全文献<br>& WO 2066061 A1 & EP 1362598 A1 & US 2004-0068207 A  | 1-13             |
| A  | JP 9-235235 A (財団法人生産開発科学研究所) 1997.09.09, 全文献<br>(ファミリーなし)  | 1-13             |
| A  | JP 2003-147418 A (科学技術振興事業団) 2003.05.21, 全文献<br>& WO 03/39793 A1  | 1-13             |
| <input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。   |   |                  |
| * 引用文献のカテゴリー<br>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの<br>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの<br>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)<br>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献<br>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの<br>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの<br>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの<br>「&」 同一パテントファミリー文献 |   |                  |
| 国際調査を完了した日<br><div style="text-align: right;">18.10.2004</div>   | 国際調査報告の発送日<br><div style="text-align: right; font-size: 1.2em;">02.11.2004</div>  |                  |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/J P)<br>郵便番号 100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号   | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br>中島 庸子<br><div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">4 J</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">8 4 1 6</div><br>電話番号 03-3581-1101 内線 3455 |                  |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**